PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-157266
(43)Date of publication of application : 17.06.1997

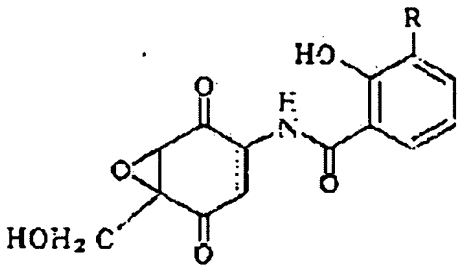
(51)Int.Cl. C07D303/36
A61K 31/335
A61K 31/335
C12P 17/02
//(C12P 17/02
C12R 1:01)

(21)Application number : 07-315542
(22)Date of filing : 04.12.1995

(71)Applicant : MICROBIAL CHEM RES FOUND
(72)Inventor : TAKEUCHI TOMIO
TSUCHIDA TOSHIO
NAKAMURA HIKARI
IINUMA HIRONOBU
SAWA TSUTOMU
OSANAWA HIROSHI
HAMADA MASA

(54) NEW ANTIBIOTIC EPOXYNOMICIN A AND B AND THEIR PRODUCTION

(57)Abstract:
PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain new antibiotics, epoxynomicin A and B, exhibiting antitumor activities and antibacterial activities against gram-positive bacteria including methicillin-resistant bacteria.
SOLUTION: Antibiotics, epoxynomicin A and B, of the formula (R is chlorine and H in the epoxynomicin A and B, respectively). The epoxynomicin A has the following physicochemical properties. Appearance and properties: pale yellowish powder, weakly acidic substance; melting point: 168-173°C (decomposition); specific rotation: [α] D25+44.6° (C 0.51, methanol); Rf value of TLC: 0.28; high resolution mass spectrum: experimental value: 332.0136 (M-H), calculated value: 332.0118; molecular



formula: C14H10NO6Cl; UV light spectrum: λmax nm (ε) 236 (sh,8900), 255 (sh,5900), 325 (sh, 8000), 370 (sh, 2700) (methanol solution). The compound of the formula is obtained by culturing an epoxynomicin A and B-producing fungus [Amycolatopsis sp. MK 299-95F4 (FERM P-15243)] belonging to the genus Amycolatopsis in a nutritive medium under an aerobic condition.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) 公開特許公報（A）　(11)特許出願公開番号

特開平9－157266

(43)公開日　平成９年(1997)６月17日

(51)Int.Cl.[6]	識別記号	庁内整理番号	ＦＩ		技術表示箇所
C07D 303/36			C07D 303/36		
A61K 31/335	ADU		A61K 31/335	ADU	
	ADZ			ADZ	
C12P 17/02			C12P 17/02		
//(C12P 17/02					

審査請求　未請求　請求項の数５　ＯＬ　（全 14 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平7－315542

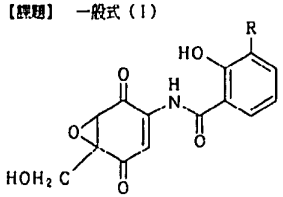
(22)出願日　平成７年(1995)12月４日

(71)出願人　000173913
財団法人微生物化学研究会
東京都品川区上大崎３丁目14番23号
(72)発明者　竹内　富雄
東京都品川区東五反田５丁目１番11号　ニューフジマンション701
(72)発明者　土田　外志夫
神奈川県相模原市矢部２丁目３番24号　ハーモニー矢部201号
(72)発明者　中村　光
東京都台東区入谷２丁目39番地９号
(74)代理人　弁理士　八木田　茂　（外２名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　新規抗生物質エポキシキノマイシンＡおよびＢとその製造法

(57)【要約】
【課題】　メチシリン耐性菌を含むグラム陽性菌に対する抗菌活性および抗腫瘍活性を示す新しい分子骨格を有する抗生物質を提供する。
【課題】　一般式（Ｉ）

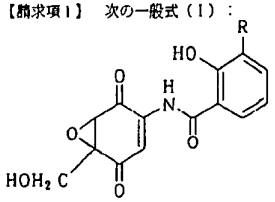


（Ｉ）

（式中、ＲはエポキシキノマイシンＡでは塩素を示し、エポキシキノマイシンＢでは水素を示す）で表わされるエポキシキノマイシンＡおよびエポキシキノマイシンＢが新規抗生物質としてアミコラトプシス sp. MK299-95F4 株の培養により得られた。エポキシキノマイシンＡおよびＢ、あるいはそれらの塩は各種の細菌に対する抗菌活性と抗腫瘍活性とを有する抗生物質である。

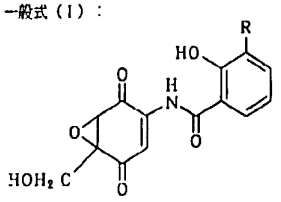
1　2

【特許請求の範囲】
【請求項１】　次の一般式（Ｉ）：



（Ｉ）

（式中、ＲはエポキシキノマイシンＡでは塩素原子を示し、またエポキシキノマイシンＢでは水素原子を示す）で表わされる化合物である抗生物質エポキシキノマイシンＡおよびエポキシキノマイシンＢ、またはそれらの塩。
【請求項２】　アミコラトプシス属に属する、請求項１に記載のエポキシキノマイシンＡおよびＢの生産菌を栄養培地に培養し、培養物からエポキシキノマイシンＡおよび（または）Ｂを採取することを特徴とする、抗生物質エポキシキノマイシンＡおよび（または）エポキシキノマイシンＢの製造法。
【請求項３】　抗生物質エポキシキノマイシンＡおよび（または）エポキシキノマイシンＢ、またはそれらの塩を有効成分とする抗菌剤。
【請求項４】　抗生物質エポキシキノマイシンＡおよび（または）エポキシキノマイシンＢ、またはそれらの塩を有効成分とする抗腫瘍剤。
【請求項５】　抗生物質エポキシキノマイシンＡおよびエポキシキノマイシンＢを生産する特性を持つアミコラトプシス sp. MK299-95F4 株。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】本発明は、抗菌活性及び抗腫瘍活性または抗癌活性を示す新規抗生物質エポキシキノマイシン(Epoxyquinomicin) ＡおよびエポキシキノマイシンＢ、あるいはこれらの塩に関し、またエポキシキノマイシンＡおよび（または）エポキシキノマイシンＢの製造法に関する。さらに本発明は、エポキシキノマイシンＡおよび（または）エポキシキノマイシンＢまたはそれらの塩を有効成分とする抗菌剤及び抗腫瘍剤に関する。また、本発明は新規抗生物質エポキシキノマイシンＡおよびＢを生産する特性を持つ新規な微生物としてのアミコラトプシス sp. MK299-95F4 株を包含する。
【０００２】
【従来の技術】種々な多数の抗菌性物質が知られており、また種々な多数の抗腫瘍性物質が知られている。
【０００３】
【発明が解決しようとする課題】細菌感染症の化学療法において、多剤耐性菌の出現は重大な問題である。従来知られているまたは使用されている既知の抗菌性化合物とは、異なる化学構造を有し且つ優れた抗菌活性を示す新しい化合物の発見または創製をすることは常に望まれており、そのための研究が行われている。また抗腫瘍性物質は、一般に強い毒性を有するものが多く、その抗腫瘍剤としての使用に当たって大きな制約となっている。そこで、毒性が低く且つ新規な化学構造を有する抗腫瘍性物質を発見または創製することが常に望まれており、そのための研究が行われている。
【０００４】
【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の要望に応えることができる抗菌活性及び抗腫瘍活性を持つ新規な抗生物質を提供することを目的に、従来より有用な抗生物質の開発と実用化の研究を促進してきた。その結果、土壌試料から新規な微生物としてアミコラトプシス属に属する菌株を分離することに成功し、またこの菌株が新しい構造骨格を有する複数の抗生物質を生産していることを見い出した。これら新規抗生物質２種を単離することに成功し、それぞれにエポキシキノマイシンＡおよびエポキシキノマイシンＢと命名した。更に、これらの新規抗生物質が薬剤耐性菌（メチシリン耐性菌等）をふくむグラム陽性の細菌に抗菌活性を示し、また癌細胞の増殖に対して抑制活性を示すことを見い出した。
【０００５】すなわち、第１の本発明においては、次の一般式（Ｉ）：



（Ｉ）

（式中、ＲはエポキシキノマイシンＡでは塩素原子を示し、またエポキシキノマイシンＢでは水素原子を示す）で表わされる化合物であるエポキシキノマイシンＡおよびエポキシキノマイシンＢ、あるいはこれらの塩が提供される。
【０００６】エポキシキノマイシンＡおよびＢは、弱酸性物質であり、それらの塩としては、第４級アンモニウム塩などの有機塩基との塩、あるいは各種金属との塩、例えばナトリウムのようなアルカリ金属との塩があり、これらの塩も上記の抗菌活性と抗腫瘍活性を有する。
【０００７】次に、抗生物質エポキシキノマイシンＡおよびＢの理化学的性状を記載する。
(1) エポキシキノマイシンＡの理化学的性状
Ａ）外観及び性質：淡黄色粉体，弱酸性物質
Ｂ）融点：　168－ 173℃（分解）
Ｃ）比旋光度：$[\alpha]_D^{25}$ ＋44.6°　（c　0.51，メタノール）
Ｄ）ＴＬＣのＲｆ値：0.28
シリカゲル（Art.105715，メルク社製）の薄層クロマト

3 4

グラフィーで展開溶媒としてクロロホルム－メタノール（10：1）で展開して測定した場合

E）マススペクトル（m／z）：324，326（M＋H）・
322，324（M－H）・

F）高分解能マススペクトル：実験値 322.0136（M－H）・
計算値 322.0118

G）分子式：$C_{14}H_{10}NO_5$ C I H）紫外線吸収スペクトル：の図4に示す。

（i）メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルは添付図面の図1に示す。主なピークは次のとおりである。

λmax nm（ε）236(sh，8900)，255(sh，5900)，325(8000)，370(sh，2700)

（ii）0.01N NaOH－メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルは添付図面の図2に示す。主なピークは次のとおりである。

λmax nm（ε）234(sh，11600)，257(sh，5100)，327(8300)，371(sh，4400)

(iii) 0.01N HCl－メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルは添付図面の図3に示す。主なピークは次のとおりである。

λmax nm（ε）253(6700)，322(8500)

I）赤外線吸収スペクトル（KBr錠剤法）：添付図面

νmax(cm^{-1}) 3450，1710，1670，1600，1520，1460，1340，1230

J）^{13}C－NMRスペクトル（CD_3OD／TMS）：添付図面の図5に示す。

K）^{1}H－NMRスペクトル（CD_3OD／TMS）：添付図面の図6に示す。

【0008】(2) エポキシキノマイシンBの理化学的性状

A）外観及び性質：淡黄色粉体，弱酸性物質

B）融点：178－184℃（分解）

C）比旋光度：〔α〕$_D^{25}$ ＋32.2°（c 0.51，メタノール）

D）TLCのRf値：0.52
シリカゲル（Art.105715，メルク社製）の薄層クロマトグラフィーで展開溶媒としてクロロホルム－メタノール（10：1）で展開して測定した場合

E）マススペクトル（m／z）：289（M）・
288（M－H）・

F）高分解能マススペクトル：実験値 290.0656（M＋H）・
計算値 290.0664

G）分子式：$C_{14}H_{11}NO_6$

H）紫外線吸収スペクトル：の図10に示す。

（i）メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルを添付図面の図7に示す。主なピークは次のとおりである。

λmax nm（ε）237(6100)，253(sh，5400)，326(6300)

（ii）0.01N NaOH－メタノール溶液中で測定した吸収スペクトルは添付図面の図8に示す。主なピークは次のとおりである。

λmax nm（ε）235(9100)，259(sh，4000)，324(5800)，376(sh，3400)

(iii) 0.01N HCl－メタノール溶液中で測定したUVスペクトルは添付図面の図9に示す。主なピークは次のとおりである。

λmax nm（ε）252(5700)，327(6500)

I）赤外線吸収スペクトル（KBr錠剤法）：添付図面

νmax(cm^{-1}) 3430，1710，1660，1610，1530，1340，1230

J）^{13}C－NMRスペクトル（CD_3OD／TMS）：添付図面の図11に示す。

K）^{1}H－NMRスペクトル（CD_3OD／TMS）：添付図面の図12に示す。

【0009】さらに、抗生物質エポキシキノマイシンAおよびBの生物学的性状を次に記載する。

【0010】A）抗菌活性

本発明による抗生物質エポキシキノマイシンAおよびBの普通栄養寒天板上での各種細菌に対する最低発育阻止濃度は、次の表1にしめす通りである。この抗菌スペクトルは日本化学療法学会標準法に基ずき、ミュラーヒントン寒天培地で倍数希釈法により測定した。

【0011】

5 6

〔表1〕

試験菌	最低発育阻止濃度（μg/ml）	
	エポキシキノマイシンA	エポキシキノマイシンB
スタヒロコッカス・アウレウス FDA 209P	12.5	12.5
スタヒロコッカス・アウレウス・スミス	12.5	12.5
スタヒロコッカス・アウレウス MS 9610	50	25
スタヒロコッカス・アウレウス MRSA No.5	25	25
スタヒロコッカス・アウレウス MS 16526	25	25
スタヒロコッカス・アウレウス TY-04282	50	25
ミクロコッカス・ルテウス FDA 16	12.5	25
ミクロコッカス・ルテウス IFO 3333	3.12	0.25
バシルス・アンスラシス	25	12.5
バシルス・サブチリス NRRL B-558	50	12.5
バシルス・セレウス ATCC 10702	25	12.5
コリネバクテリウム・ボビス 1810	50	50
エシェリヒア・コリ NIHJ	100	50
エシェリヒア・コリ BE 1121	50	50
エシェリヒア・コリ BB 1186	50	50
シゲラ・デイセンテリエ JS 11910	50	50
シウドモナス・エルギノサ A 3	>50	>50
パストレラ・ピシシダ sp.6395	12.5	12.5
パストレラ・ピシシダ sp.6356	12.5	12.5
パストレラ・ピシシダp－3347	3.12	12.5

【0012】B）癌細胞増殖抑制活性

各種の癌細胞を用いて癌細胞の増殖を50%抑制するエポキシキノマイシンAおよびエポキシキノマイシンBの濃度（IC_{50}値）を、MTT法（「Journal of Immunological Methods」65巻，55－60頁(1983)参照）で測定した。その結果を表2に示す。

【0013】

〔表2〕

供試癌細胞	IC_{50}(μg/ml)	
	エポキシキノマイシンA	エポキシキノマイシンB
マウス白血病 L1200	2.64	16.3
マウス IMCカルシノーマ	9.67	17.9
マウスザルコーマ S180	7.67	
マウス黒色腫 B16－BL6	7.97	

【0014】表1の結果から明らかなように、本発明による抗生物質エポキシキノマイシンAおよびBは、各種の細菌に対して抗菌活性を有するから抗菌剤として有用である。また、表2の結果から明らかなように、エポキシキノマイシンAおよびBは各種の癌細胞の増殖を抑制する抗腫瘍活性または抗癌活性を有するから抗腫瘍剤ま

たは抗癌剤として有用である。

【００１５】さらに第２の本発明によれば、アミコラトプシス属に属する、前記の一般式（Ｉ）のエポキシキノマイシンＡおよびＢの生産菌を栄養培地に培養し、培養物からエポキシキノマイシンＡおよび（または）エポキシキノマイシンＢを採取することを特徴とする、抗生物質エポキシキノマイシンＡおよび（または）エポキシキノマイシンＢの製造法が提供される。

【００１６】第２の本発明の方法で使用できるエポキシキノマイシンＡおよびＢの生産菌の一例としては、アミコラトプシス sp. MK299-95F4 株がある。この菌株は平成６年10月、微生物化学研究所において、宮城県仙台市の土壌より分離された放線菌で、MK299-95F4の菌株番号が付された微生物である。

【００１７】このMK299-95F4株の菌学的性状を次に記載する。

１．形態

基生菌糸はよく分枝し、ジクザグ状を呈する。また分断が認められる。気菌糸は直状あるいは不規則な曲状で、円筒形～長円形の断片または胞子様の構造に分断する。その表面は平滑であり、大きさは約 0.4～ 0.6× 1.1～ 1.6ミクロンである。輪生枝、菌束糸、胞子のう及び遊動性胞子は認められない。

【００１８】２．各種培地における生育状態

色の記載について〔 〕内に示す標準は、コンティナー・コーポレーション・オブ・アメリカのカラー・ハーモニー・マニュアル（Container Corporation ofAmerica のcolor harmony manual）を用いた。

(1) シュクロース・硝酸塩寒天培地（27℃培養）

無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

(2) グルコース・アスパラギン寒天培地（27℃培養）

うす黄〔２ea, Lt Wheat～２gc, Bamboo〕の発育上に、白の気菌糸を着生し、溶解性色素は黄を帯びる。

(3) グリセリン・アスパラギン寒天培地（ＩＳＰ－培地５、27℃培養）

うす黄茶〔３ie, Camel～３le, Cinnamon〕の発育上に、白の気菌糸を着生し、溶解性色素は黄茶を帯びる。

(4) スターチ・無機塩寒天培地（ＩＳＰ－培地４、27℃培養）

無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

【００１９】(5) チロシン寒天培地（ＩＳＰ－培地７、27℃培養）

うす黄茶〔２lg, Mustard Tan〕～灰味黄茶〔３lg, Adobe Brown〕の発育上に、白の気菌糸を着生し、溶解性色素はうす黄茶を呈する。

(6) 栄養寒天培地（27℃培養）

うす橙〔２ea, Lt Wheat〕の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

(7) イースト・麦芽寒天培地（ＩＳＰ－培地２、27℃培養）

うす黄茶〔３ic, Lt Amber〕の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

(8) オートミール寒天培地（ＩＳＰ－培地３、27℃培養）

無色～うす黄〔Ｉ１/２ca, Cream〕の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

(9) スターチ寒天培地（27℃培養）

無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

(10) リンゴ酸石灰寒天培地（27℃培養）

無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

【００２０】３．生理的性質

(1) 生育温度範囲

グルコース・アスパラギン寒天培地（グルコース 1.0 %、Ｌ－アスパラギン0.05%、リン酸水素二カリウム 0.05%、ひも寒天 3.0%、 pH7.0）を用い、10℃、20℃、24℃、27℃、30℃、37℃および50℃の各温度で試験した結果、10℃、50℃での生育は認められず、20℃～37℃の範囲で生育した。生育至適温度は27℃付近と思われる。

(2) スターチの加水分解（スターチ・無機塩寒天培地、ＩＳＰ－培地４及びスターチ寒天培地、いずれも27℃培養）

21日間の培養で、いずれの培地においても陰性である。

(3) メラニン様色素の生成（トリプトン・イースト・ブロス、ＩＳＰ－培地１：ペプトン・イースト・鉄寒天培地、ＩＳＰ－培地６：チロシン寒天培地、ＩＳＰ－培地７；いずれも27℃培養）

いずれの培地においても陰性である。

【００２１】(4) 炭素源の利用性（プリドハム・ゴドリーブ寒天培地、ＩＳＰ－培地９；27℃培養）

Ｄ－グルコース、Ｄ－フルクトース、イノシトール、Ｄ－マンニトールを利用して発育し、Ｌ－アラビノース、シュクロース、ラムノース、ラフィノースは利用しない。Ｄ－キシロースの利用の存否は判然としない。

(5) リンゴ酸石灰の溶解（リンゴ酸石灰寒天培地、27℃培養）

培養後１０日目頃よりリンゴ酸石灰の溶解が認められ、その作用は中等度である。

(6) 硝酸塩の還元反応(0.1%硝酸カリウム含有ペプトン水、ＩＳＰ－培地８、27℃培養）

陰性である。

【００２２】以上の性状を要約すると、MK299-95F4株は、その形態上、基生菌糸はよく分枝し、ジグザク状を呈し、分断を認める。気菌糸は直状あるいは不規則な曲状で、円筒形～長円形の断片または胞子様の構造に分断する。輪生枝、菌束糸、胞子のう及び遊動性胞子は認められない。種々の培地で、無色～うす黄～うす黄茶の発育上に白の気菌糸を着生する。一部の培地で溶解性色素は黄あるいは黄茶を帯びる。メラニン様色素の生成、スターチの水解性及び硝酸塩の還元反応はいずれも陰性である。

【００２３】ところで、MK299-95F4株の菌体成分は、細胞壁にメソ型の２，６－ジアミノピメリン酸、アラビノース及びガラクトースを含み、細胞壁タイプIV型を示した。全菌体中の還元糖はアラビノース、ガラクトースを含むA型であった。グリコレートテストの結果はアセチル型であった。また、ミコール酸は含有せず、リン脂質はPII型（ホスファチジルエタノールアミンを含みホスファチジルコリン及び未知のグルコサミン含有リン脂質を含まない）、主要なメナキノンはＭＫ－９（Ｈ４）であった。脂肪酸は16：０，１－15：０，16：１，１－16：０及び17：０を主成分とした。

【００２４】以上の結果より、MK299-95F4株はアミコラトプシス(Amycolatopsis) 属（文献：「International Journal of Systematic Bacteriology」36巻，29－37頁，1986年)に属するものと考えられる。アミコラトプシス属の既知菌種を検索すると、アミコラトプシス・スルフレア(Amycolatopsis sulphurea)（文献１：同上；および文献２:「International Journal of Systematic Bacteriology」37巻，292－ 295頁，1987年）が、近縁の種としてあげられた。そこで、MK299-95F4株とアミコラトプシス・スルフレアの当研究所保存菌株とを実地に比較検討中である。現時点ではMK299-95F4株をアミコラトプシス・エスピー(Amycolatopsis sp.) MK299-95F4とする。なお、MK299-95F4株を工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託申請し、平成７年10月17日、寄託番号がFERM P-15243として受託された。

【００２５】第２の本発明の方法を実施するに当っては、アミコラトプシス属に属するエポキシキノマイシンＡおよびＢの生産菌を栄養培地に接種し、この培地中で培養する。ここで用いる栄養培地は、前記の生産菌が資化できる炭素源と窒素源を栄養成分として含有するものである。

【００２６】その栄養源としては、通常微生物の栄養源として通常使用されるもの、例えば炭素源、窒素源、無機塩などの同化できる栄養源を使用できる。例えば、ぶどう糖、麦芽糖、糖蜜、デキストリン、グリセリン、澱粉などの炭化水素や、大豆油、落花生油などの油脂のごとき炭素源、ならびにペプトン、肉エキス、綿実粉、大豆粉、酵母エキス、カゼイン、コーン・スチープリカー、ＮＺ－アミン、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウムなどの窒素源、さらに燐酸二カリウム、燐酸ナトリウム、食塩、炭酸カルシウム、硫酸マグネシウム、塩化マンガンなどの無機塩が使用でき、必要により微量金属例えばコバルト、鉄などを添加することができる。栄養源としては、その他、抗生物質エポキシキノマイシンＡおよびＢを生産するのに使用菌が利用しうるものであればいずれの公知の栄養源でも使用できる。

【００２７】培地における上記のごとき栄養源の配合割合は特に制約されるものでなく、広範囲に亘って変えることができ、使用するエポキシキノマイシンＡおよびＢ生産菌によって、最適の栄養源の組成及び配合割合は、当事者であれば簡単な小規模実験により容易に決定することができる。また、上記の栄養源からなる栄養培地は、培養に先立ち殺菌することができ、この殺菌の前又は後で、培地のｐＨを６－８の範囲、特にpH 6.5－ 7.5の範囲に調節するのが有利である。

【００２８】かかる栄養培地でのエポキシキノマイシンＡおよびＢ生産菌の培養は、一般の放線菌による抗生物質の製造において通常使用されている方法に準じて行なうことができる。通常は好気条件下に培養するのが好適であり、撹拌しながら及び／又は通気しながら行なうことができる。また、培養方法としては静置培養、振とう培養、通気撹拌をともなう液内培養のいずれも使用可能であるが、液体培養がエポキシキノマイシンＡおよびＢの大量生産に適している。

【００２９】使用しうる培養温度はエポキシキノマイシンＡおよびＢ生産菌の発育が実質的に阻害されず、該抗生物質を生産しうる範囲であれば、特に制限されるものではなく、使用する生産菌に応じて適宜選択できるが、特に好ましいのは25－30℃の範囲内の温度を挙げることができる。培養は通常はエポキシキノマイシンＡおよびＢが十分に蓄積するまで継続することができる。その培養時間は培地の組成や培養温度、使用菌株、使用生産菌株などにより異なるが、通常72－ 120時間の培養で目的の抗生物質を得ることができる。

【００３０】培養中の培地内のエポキシキノマイシンＡおよびＢの蓄積量はスタヒロコッカス・アウレウス・スミスを使用して、通常の抗生物質の定量に用いられる円筒平板法により定量することができる。

【００３１】かくして培養物中に蓄積されたエポキシキノマイシンＡおよびＢは、これを培養物から採取する。培養後、必要により、濾過、遠心分離などのそれ自体公知の分離方法によって培養物から菌体を除去した後、その培養濾液を酸性(pH 2－４）に調整し有機溶媒、特に酢酸エチルなどを用いた溶媒抽出や、吸着やイオン交換能を利用したクロマトグラフィー、ゲルろ過、向流分配を利用したクロマトグラフィーを単独または、組み合わせて使用することにより単離精製して目的の抗生物質を採取することができる。吸着やイオン交換能を有するクロマトグラフィー用担体としては、活性炭、シリカゲル、多孔性ポリスチレンージビニルベンゼン樹脂もしくは各種のイオン交換樹脂を用いることができる。また、分離した菌体からは、適当な有機溶媒を用いた溶媒抽出法や菌体破砕による溶出法により菌体から目的の抗生物

質を抽出し、上記と同様に単離精製することができる。かくして、前記した特性を有する新規抗生物質エポキシキノマイシンAおよびBが得られる。

【００３２】さらに、第３の本発明では、一般式（Ｉ）で表されるエポキシキノマイシンAおよび（または）エポキシキノマイシンBまたはそれらの製薬学的に許容できる塩を有効成分とする抗菌剤が提供される。

【００３３】また、第４の本発明においては、一般式（Ｉ）で表されるエポキシキノマイシンAおよび（または）エポキシキノマイシンBまたはそれらの製薬学的に許容できる塩を有効成分とする抗腫瘍剤が提供される。

【００３４】この抗菌剤または抗腫瘍剤においては、有効成分としてのエポキシキノマイシンAおよび（または）Bあるいはその塩は製薬学的に許容できる常用の固体または液体担体、例えばエタノール、水、でん粉等と混和されている形の組成物であることができる。

【００３５】また、第５の本発明では、新規な微生物として、前記の一般式（Ｉ）のエポキシキノマイシンAおよびBを生産する特性を持つアミコラトプシス sp. MK299-95F4 株が提供される。

【００３６】

【発明の実施の形態】次に実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されるものでない。

【００３７】実施例１　抗生物質エポキシキノマイシンAおよびBの製造

グリセリン 0.5%、シュークロース　２%、大豆粉　１%、乾燥酵母　１%、コーン・スチープ・リカー 0.5%、塩化コバルト 0.001%を含む液体培地(pH7.0に調整) を三角フラスコ(500ml容) に 110mlずつ分注し、常法により 120℃で20分滅菌した。これらの培地に、寒天斜面培地に培養したアミコラトプシス sp.MK299-95F4 株（FERM P-15243）を接種し、その後30℃で５日間回転振とう培養した。これにより種母培養液を得た。

【００３８】グリセリン　２%、デキストリン　２%、バクトーソイトン　１%、粉末酵母エキス 0.3%、硫酸アンモニウム 0.2%、炭酸カルシウム 0.2%、シリコーンオイル１滴を含む液体培地(pH7.4に調整) を三角フラスコ(500ml容) に 110mlずつ分注し、常法により 120℃で20分滅菌した。その後、これら培地に、上記種母培養液をそれぞれ２mlずつ接種し、27℃で４日間回転振とう培養した。

【００３９】このようにして得られた培養液を濾過して菌体を分離した。培養ろ液2.55リットルは、６Ｎ－HClによりpH２にした後に酢酸ブチル2.55リットルで抽出し、酢酸ブチル層を無水硫酸ナトリウムにより乾燥した。酢酸ブチル層を減圧下で濃縮乾固し、残渣をメタノール50mlに溶かしヘキサン50mlで２回洗浄し、メタノール層を減圧下で濃縮乾固した。

【００４０】得られた残渣をクロロホルム－メタノール－水(50：10：40,100ml)で分配し、下層を減圧下で濃縮乾固すると、茶色の油状物(0.515ｇ）が得られた。この油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Kiesel gel 60, メルク社製, 50ml）に付し、トルエン－アセトン混合溶媒（10：１, ７：１, ５：１, ３：１, ２：１）で順次溶出した。得られた活性画分を同条件のシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、トルエン－アセトン混合溶媒（50：１, 20：１, 10：１, ７：１）で順次溶出した。エポキシキノマイシンAおよびBの混合物が 124mg得られた。この混合物の35mgをシリカゲルＴＬＣ（展開溶媒：クロロホルム－メタノール, 20：１）にかけて分離精製した。

【００４１】エポキシキノマイシンAが融点 168～ 173℃（分解）の淡黄色粉末として20mgの収量で得られ、またエポキシキノマイシンBが融点 178～ 184℃（分解）の淡黄色粉末として10mgの収量で得られた。

【図面の簡単な説明】

【図１】エポキシキノマイシンAのメタノール溶液中の紫外線吸収スペクトルである。

【図２】エポキシキノマイシンAの0.01Ｎ　NaOH－メタノール溶液中の紫外線吸収スペクトルである。

【図３】エポキシキノマイシンAの0.01Ｎ HCl－メタノール溶液中の紫外線吸収スペクトルである。

【図４】エポキシキノマイシンAのＫＢｒ錠剤法で測定した赤外線吸収スペクトルである。

【図５】エポキシキノマイシンAの重メタノール溶液（内部標準：トリメチルシラン）にて測定したプロトン核磁気共鳴スペクトルである。

【図６】エポキシキノマイシンAの重メタノール溶液（内部標準：トリメチルシラン）にて測定した炭素13核磁気共鳴スペクトルである。

【図７】エポキシキノマイシンBのメタノール溶液の紫外線吸収スペクトルである。

【図８】エポキシキノマイシンBの0.01Ｎ　NaOH－メタノール溶液中の紫外線吸収スペクトルである。

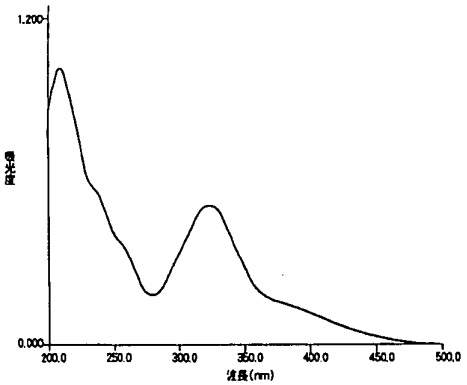
【図９】エポキシキノマイシンBの0.01Ｎ HCl－メタノール溶液中の紫外線吸収スペクトルである。

【図１０】エポキシキノマイシンBのＫＢｒ錠剤法で測定した赤外線吸収スペクトルである。

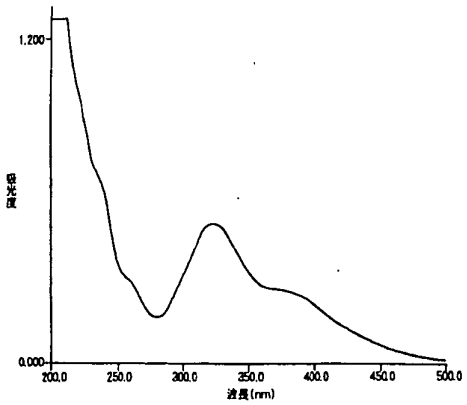
【図１１】エポキシキノマイシンBの重メタノール溶液（内部標準：トリメチルシラン）にて測定したプロトン核磁気共鳴スペクトルである。

【図１２】エポキシキノマイシンBの重メタノール溶液（内部標準：トリメチルシラン）にて測定した炭素13核磁気共鳴スペクトルである。

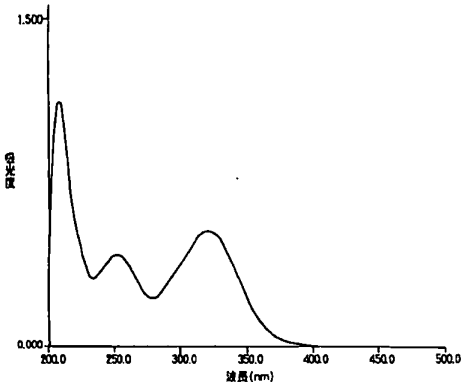
【図１】



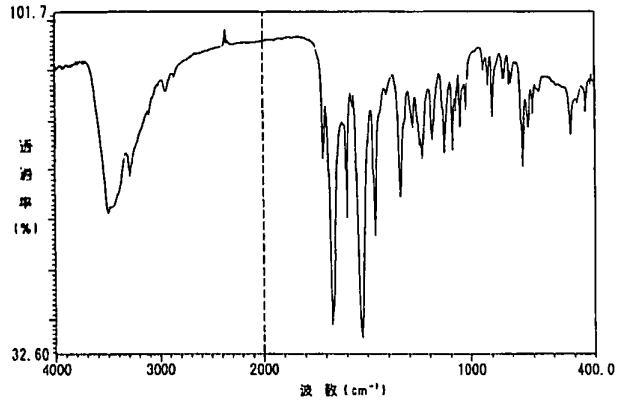
【図２】



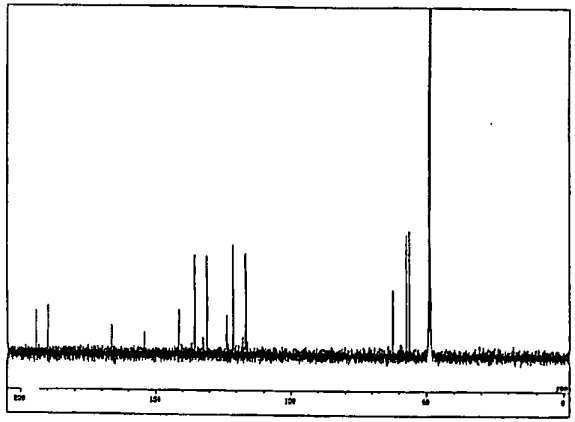
【図3】


1.500
0.000
200.0
250.0
300.0
350.0
400.0
450.0
500.0
波長(nm)

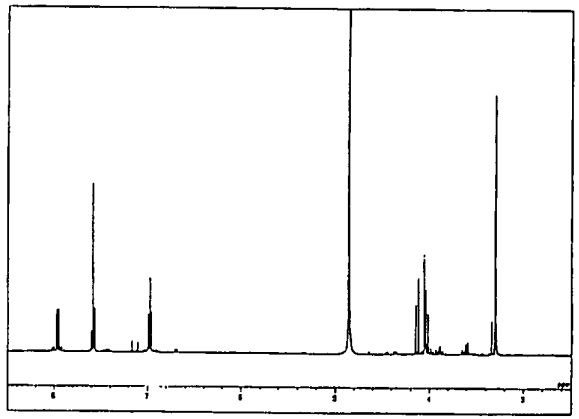
【図4】


101.7
32.60
4000
3000
2000
1000
400.0
波 数 (cm⁻¹)

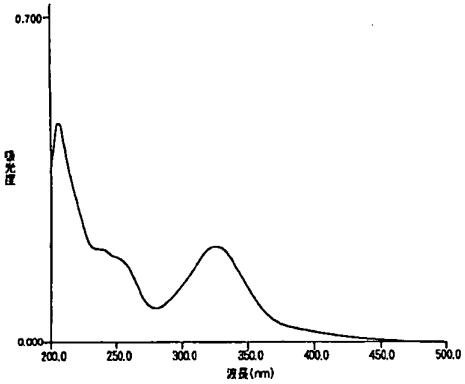
【図5】



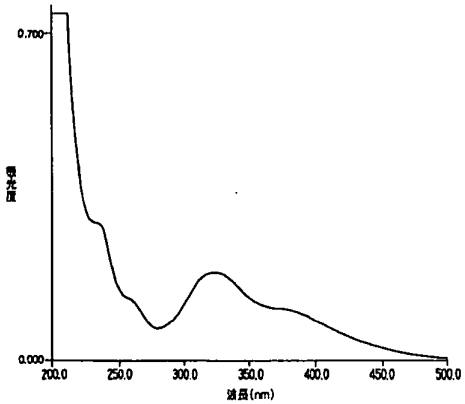
【図6】



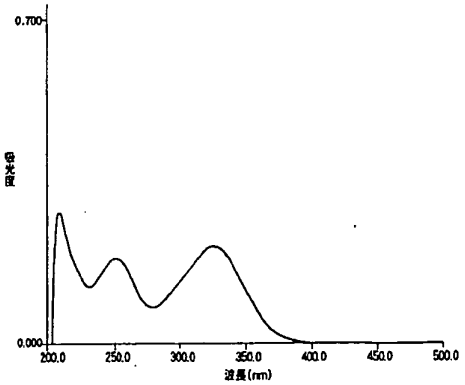
【図７】


0.700
0.000
200.0
250.0
300.0
350.0
400.0
450.0
500.0
波長(nm)

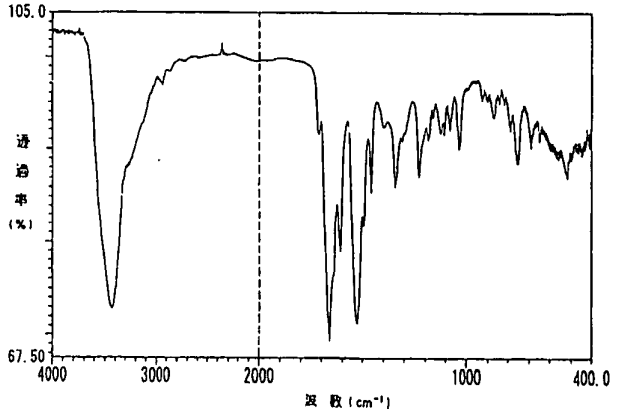
【図８】


0.700
0.000
200.0
250.0
300.0
350.0
400.0
450.0
500.0
波長(nm)

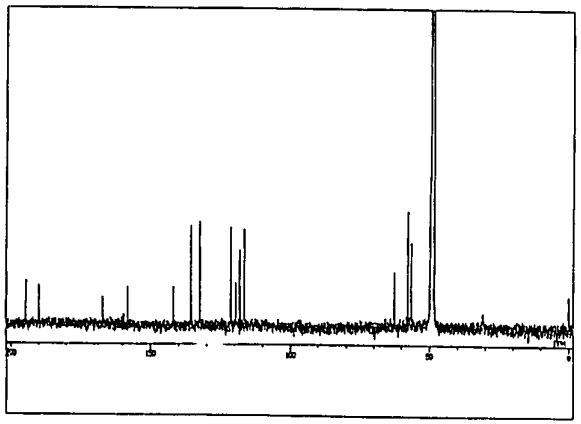
【図９】


0.700
0.000
200.0
250.0
300.0
350.0
400.0
450.0
500.0
波長(nm)

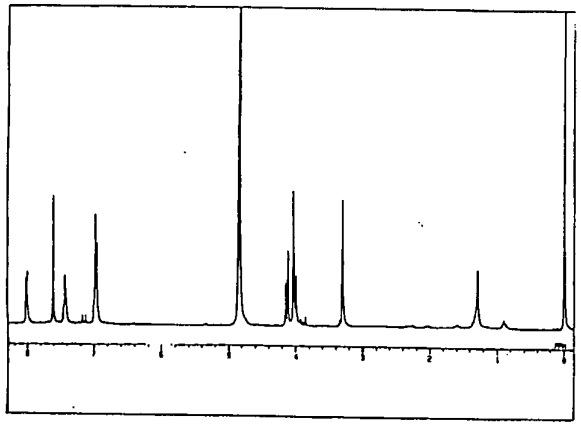
【図１０】


105.0
67.50
4000
3000
2000
1000
400.0
波数(cm⁻¹)

【図１１】



【図１２】



【手続補正書】
【提出日】平成８年４月２６日
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１０
【補正方法】変更
【補正内容】
【００１０】Ａ）抗菌活性

本発明による抗生物質エポキシキノマイシンＡおよびＢの各種細菌に対する最低発育阻止濃度は、次の表１にしめす通りである。この抗菌スペクトルは日本化学療法学会標準法に基ずき、ミュラーヒントン寒天培地で倍数希釈法により測定した。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】００２１
【補正方法】変更
【補正内容】
【００２１】(4) 炭素源の利用性（プリドハム・ゴドリーブ寒天培地、ＩＳＰ－培地９：27℃培養）
d－グルコース、d－フルクトース、イノシトール、d－マンニトールを利用して発育し、l－アラビノース、シュクロース、ラムノース、ラフィノースは利用しない。d－キシロースの利用の存否は判然としない。
(5) リンゴ酸石灰の溶解（リンゴ酸石灰寒天培地、27℃培養）
培養後１０日目頃よりリンゴ酸石灰の溶解が認められ、その作用は中等度である。
(6) 硝酸塩の還元反応(0.1％硝酸カリウム含有ペプトン水、ＩＳＰ－培地８、27℃培養)
陰性である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[6]	識別記号	庁内整理番号	Ｆ１	技術表示箇所
Ｃ１２Ｒ　1:01)				

(72)発明者　飯沼　寛信
神奈川県横浜市緑区白山４丁目61番17号
(72)発明者　潭　力
神奈川県綾瀬市綾西四丁目６番７号
(72)発明者　長縄　博
東京都大田区田園調布本町３番17号
(72)発明者　濱田　雅
東京都新宿区内藤町１番地26　秀和レジデンス405号

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-157266
(43)Date of publication of application : 17.06.1997

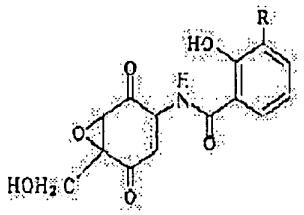
(51)Int.Cl. C07D303/36
A61K 31/335
A61K 31/335
C12P 17/02
//(C12P 17/02
C12R 1:01)

(21)Application number : 07-315542
(22)Date of filing : 04.12.1995

(71)Applicant : MICROBIAL CHEM RES FOUND
(72)Inventor : TAKEUCHI TOMIO
TSUCHIDA TOSHIO
NAKAMURA HIKARI
IINUMA HIRONOBU
SAWA TSUTOMU
OSANAWA HIROSHI
HAMADA MASA

(54) NEW ANTIBIOTIC EPOXYNOMICIN A AND B AND THEIR PRODUCTION

(57)Abstract:
PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain new antibiotics, epoxynomicin A and B, exhibiting antitumor activities and antibacterial activities against gram-positive bacteria including methicillin-resistant bacteria.
SOLUTION: Antibiotics, epoxynomicin A and B, of the formula (R is chlorine and H in the epoxynomicin A and B, respectively). The epoxynomicin A has the following physicochemical properties. Appearance and properties: pale yellowish powder, weakly acidic substance; melting point: 168-173° C (decomposition); specific rotation: [α] D25+44.6° (C 0.51, methanol); Rf value of TLC: 0.28; high resolution mass spectrum: experimental value: 332.0136 (M-H), calculated value: 332.0118; molecular formula: C14H10NO6Cl; UV light spectrum: λmax nm (ε) 236 (sh,8900), 255 (sh,5900), 325 (sh, 8000), 370 (sh, 2700) (methanol solution). The compound of the formula is obtained by culturing an epoxynomicin A and B-producing fungus [Amycolatopsis sp. MK 299-95F4 (FERM P-15243)] belonging to the genus Amycolatopsis in a nutritive medium under an aerobic condition.



LEGAL STATUS
[Date of request for examination]
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

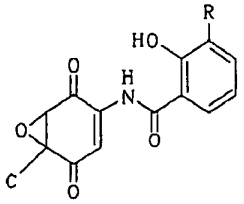
http://www19.ipdl.ncipi.go.jp/PA1/result/detail/main/wAAA.QaWiWDA409157266P1.... 17/07/11

* NOTICES *

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2.**** shows the word which can not be translated.
3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The following general formula (I) :  (I)

They are the antibiotic epoxy quinomycin A which is expressed with (R showing a chlorine atom by epoxy quinomycin A, and showing a hydrogen atom by epoxy kino mycin B among a formula) and which is a compound and epoxy kino mycin B, or those salts.
[Claim 2] the manufacturing method of the antibiotic epoxy quinomycin A which cultivates the epoxy quinomycin A according to claim 1 belonging to the Amycolatopsis group, and the production bacillus of B to a nutrition culture medium, and is characterized by extracting epoxy quinomycin A and (or) B from a culture, and (or) epoxy kino mycin B.
[Claim 3] the antimicrobial agent which makes an active principle antibiotic epoxy quinomycin A and (or) epoxy kino mycin B, or those salts.
[Claim 4] the antitumor agent which makes an active principle antibiotic epoxy quinomycin A and (or) epoxy kino mycin B, or those salts.
[Claim 5] Amycolatopsis with the property of producing antibiotic epoxy quinomycin A and epoxy kino mycin B sp.MK299-95F4 Stock.

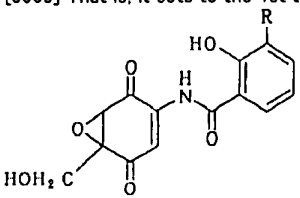
[Translation done.]

* NOTICES *

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2.**** shows the word which can not be translated.
3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]
[0001]
[Field of the Invention] this invention relates to the manufacturing method of epoxy quinomycin A and (or) epoxy kino mycin B, concerning the new antibiotic epoxy kino mycin (Epoxyquinomicin) A which shows antimicrobial activity and antitumor activity, or anticancer activity and epoxy kino mycin B, or these salts. furthermore, this invention relates to the antimicrobial agent and antitumor agent which make an active principle epoxy quinomycin A and (or) epoxy kino mycin B, or those salts. Moreover, this invention is Amycolatopsis as a new microorganism with the property of producing new antibiotic epoxy quinomycin A and B. sp.MK299-95F4 A stock is included.
[0002]
[Description of the Prior Art] The antibacterial substance of various large number is known, and the anticancer matter of various large number is known.
[0003]
[Problem(s) to be Solved by the Invention] In the chemotherapy of the microbism, the appearance of a drug-resistant strain is a serious problem. To carry out the discovery or the invention of a new compound whose known antibacterial compound currently used or it is known conventionally shows the antimicrobial activity which has the different chemical structure and was excellent is always desired, and research for it is done. Moreover, the anticancer matter has many which generally have strong toxicity, and serves as big constraint in the use as the antitumor agent. Then, toxicity is always wanted to discover or invent the anticancer matter which has the low and new chemical structure, and research for it is done.
[0004]
[Means for Solving the Problem] this invention persons have promoted development of an antibiotic more useful than before and research of utilization for the purpose of offering a new antibiotic with the antimicrobial activity and antitumor activity which can meet the above-mentioned request. Consequently, it found out producing two or more antibiotics which succeed in separating the strain which belongs to the Amycolatopsis group as a new microorganism from a soil sample, and have a soil skeleton with this new strain. It succeeded in isolating two sorts of these new antibiotics, and each was named epoxy quinomycin A and epoxy kino mycin B. Furthermore, it found out that antimicrobial activity was shown in the gram-positive bacteria with which these new antibiotics contain drug resistance bacteria (methicillin resistant bacteria etc.), and control activity was shown to growth of a cancer cell.
[0005] That is, it sets to the 1st this invention and is the following general formula (I). :



(I)

The epoxy quinomycin A which is the compound expressed with (R showing a chlorine atom by epoxy quinomycin A, and showing a hydrogen atom by epoxy kino mycin B among a formula) and epoxy kino mycin B, or these salts are offered.
[0006] It is the weak acidic matter, and as those salts, there is a salt with organic bases, such as quarternary ammonium salt, or a salt with various metals, for example, a salt with alkali metal like sodium, and, as for epoxy quinomycin A and B, these salts also have above-mentioned antimicrobial activity and antitumor activity.
[0007] next, antibiotic epoxy quinomycin A and B are physicochemical -- description is indicated.
(1) epoxy quinomycin A is physicochemical -- description -- A appearance and property: -- light yellow fine particles and weak acidic matter B melting point: 168 to 173 degree C (decomposition)
With the thin-layer chromatography of 0.28 silica gel (Art.105715, Merck Co. make), The Rf value of 25+44.6 degree (c 0.51, methanol) DTLC of specific-rotation:[alpha] D : C) As an expansion solvent When it developed and measures with a chloroform-methanol (10:1) E mass spectrum (m/z) : [324 326(M+H)+] 322, 324(M-H)- F high-resolution mass spectrum: Experimental value 322.0136(M-H)- calculated value 322.0118G molecular formula: -- C14H10NO6 CIH ultraviolet absorption spectrum: -- UV absorption spectrum measured in (i) methanol solution is shown in drawing 1 of an accompanying drawing. The main peaks are as follows.
lambdamax nm (epsilon)236 (sh, 8900), 255 (sh, 5900), 325 (8000), 370(sh, 2700) (ii)0.01N UV absorption spectrum measured in the NaOH-methanol solution is shown in drawing 2 of an accompanying drawing. The main peaks are as follows.
UV absorption spectrum measured in lambdamax nm (epsilon)234 (sh, 11600), 257 (sh, 5100), 327 (8300), and a 371 (sh, 4400) (iii) 0.01N HCl-methanol solution is shown in drawing 3 of an accompanying drawing. The main peaks are as follows.
lambdamax nm (epsilon)253 (6700), a 322(8500) I infrared absorption spectrum (KBr briquette method): It is shown in drawing 4 of an accompanying drawing.
numax (cm-1) 3450, 1710, 1670, 1600, 1520, 1460, 1340, a 1230J 13 C-NMR spectrum (CD3 OD/TMS): It is shown in drawing 5 of an accompanying drawing.
K) 1 H-NMR spectrum (CD3 OD/TMS) : it is shown in drawing 6 of an accompanying drawing.
[0008] (2) epoxy kino mycin B is physicochemical -- description -- A appearance and property: -- light yellow fine particles and weak acidic matter B melting point: 178 to 184 degree C (decomposition)
With the thin-layer chromatography of 0.52 silica gel (Art.105715, Merck Co. make), The Rf value of 25+32.2 degree (c 0.51, methanol) DTLC of specific-rotation:[alpha] D : C) As an expansion solvent When it developed and measures with a chloroform-methanol (10:1) E mass spectrum (m/z) : 289(M)+ 288(M-H)- F high-resolution mass spectrum: Experimental value 290.0656(M+H)+ Calculated value 290.0664G molecular formula: -- C14H11NO6H ultraviolet absorption spectrum: -- UV absorption spectrum measured in (i) methanol solution is shown in drawing 7 of an accompanying drawing. The main peaks are as follows.
lambdamax nm (epsilon)237 (6100), 253 (sh, 5400), 326(6300) (ii)0.01N The absorption spectrum measured in the NaOH-methanol solution is shown in drawing 8 of an accompanying drawing. The main peaks are as follows.
UV spectrum measured in lambdamax nm (epsilon)235 (9100), 259 (sh, 4000), 324 (5800), and a 376 (sh, 3400) (iii) 0.01N HCl-methanol solution is shown in drawing 9 of an accompanying drawing. The main peaks are as follows.
lambdamax nm (epsilon)252 (5700), a 327(6500) I infrared absorption spectrum (KBr briquette method): It is shown in drawing 10 of an accompanying drawing.
numax (cm-1) 3430, 1710, 1660, 1610, 1530, 1340, a 1230J 13 C-NMR spectrum (CD3 OD/TMS): It is shown in drawing 11 of an accompanying drawing.
K) 1 H-NMR spectrum (CD3 OD/TMS) : it is shown in drawing 12 of an accompanying drawing.
[0009] furthermore, antibiotic epoxy quinomycin A and B are biological -- description is indicated below.

[0010] A) The antibiotic epoxy quinomycin A by antimicrobial activity this invention and the minimum growth inhibition concentration [usually as opposed to the various bacteria on a nutrient agar plate] of B are as being shown in the next table 1. This antimicrobial spectrum was measured with the multiple dilution method by ****** and the Mueller HINTON agar medium by the Japanese Society of Chemotherapy standard method.

[0011]

(表1)

試　　験　　菌	最低発育阻止濃度（μg/ml）	
	エポキシキノマイシンA	エポキシキノマイシンB
スタヒロコッカス・アウレウス FDA 209P	12.5	12.5
スタヒロコッカス・アウレウス・スミス	12.5	12.5
スタヒロコッカス・アウレウス MS 9610	50	25
スタヒロコッカス・アウレウス MRSA No.5	25	25
スタヒロコッカス・アウレウス MS 16526	25	25
スタヒロコッカス・アウレウス TY-04282	50	25
ミクロコッカス・ルテウス FDA 16	12.5	25
ミクロコッカス・ルテウス IFO 3333	3.12	6.25
バシルス・アンスラシス	25	12.5
バシルス・サブチリス NRRL B-558	50	12.5
バシルス・セレウス ATCC 10702	25	12.5
コリネバクテリウム・ボビス 1810	50	50
エシェリヒア・コリ NIHJ	100	50
エシェリヒア・コリ BE 1121	50	50
エシェリヒア・コリ BB 1186	50	50
シゲラ・デイセンテリエ JS 11910	50	50
シウドモナス・エルギノサ A3	>50	>50
パストレラ・ピシシダ sp.6395	12.5	12.5
パストレラ・ピシシダ sp.6356	12.5	12.5
パストレラ・ピシシダp-3347	3.12	12.5

[0012] B) The concentration (IC50 value) of the epoxy quinomycin A which controls growth of a cancer cell 50% using the cancer cell of cancer cell growth control activity various kinds, and epoxy kino mycin B was measured by the MTT method ("Journal of Immunological Methods" refer to 65 volumes, and 55 -60 pages (1983)). The result is shown in Table 2.

[0013]

(表2)

供試癌細胞	IC_{50}（μg/ml）	
	エポキシキノマイシンA	エポキシキノマイシンB
マウス白血病 L1200	2.64	16.3
マウス IMCカルシノーマ	9.67	17.9
マウスザルコーマ S180	7.67	
マウス黒色腫 B16-BL6	7.97	

[0014] Since the antibiotic epoxy quinomycin A and B by this invention have antimicrobial activity to various kinds of bacteria, they are useful as an antimicrobial agent, so that clearly from the result of Table 1. Moreover, since epoxy quinomycin A and B have the antitumor activity or anticancer activity which controls growth of various kinds of cancer cells, they are useful as an antitumor agent or an anticancer agent, so that clearly from the result of Table 2.

[0015] furthermore, according to the 2nd this invention, the epoxy quinomycin A of the aforementioned general formula (I) belonging to the Amycolatopsis group and the production bacillus of B are cultivated to a nutrition culture medium, and the manufacturing method of the antibiotic epoxy quinomycin A characterized by extracting epoxy quinomycin A and (or) epoxy kino mycin B from a culture and (or) epoxy kino mycin B is offered.

[0016] As an example of the epoxy quinomycin A which can be used by the approach of the 2nd this invention, and the production bacillus of B, it is Amycolatopsis. sp.MK299-95F4 There is a stock. In a microorganism national chemical laborator, this strain is the Actinomyces separated from the soil of Sendai, Miyagi, and will be the microorganism to which the strain number of MK299-95F4 was given in October, Heisei 6.

[0017] This MK299-95F4 share mycology-description is indicated below.

1. Branch gestalt radical viable cell yarn well, and it presents the letter of zigzag. Moreover, fragmentation is accepted. Aerial mycelia have the shape of direct, and the shape of irregular music, and are divided in the fragment of a cylindrical shape - an ellipse, or the spore's structure. The front face is smooth and magnitude is abbreviation. It is 0.4 to 0.6x1.1-1.6 microns. a whorl branch, ******, and a spore obtain and a movement sexual spore is not accepted.

[0018] 2. The color harmony manual (color harmony manual of Container Corporation ofAmerica) of the container corporation OBU United States was used for the criterion shown in [ ] about the publication of the growth condition color in various culture media.

(1) Sucrose and a nitrate agar medium (27-degree-C culture)

On colorless growth, white aerial mycelium is grown slightly, and soluble coloring matter is not accepted.

(2) Glucose asparagine agar medium (27-degree-C culture)

Growing white aerial mycelium on growth of light yellow [2ea, Lt Wheat-2gc, Bamboo], soluble coloring matter wears yellow.

(3) Glycerol asparagine agar medium (5 or 27 degrees-C culture of ISP-culture media)

Growing white aerial mycelium on growth of light yellow tea [3ie, Camel-3le, Cinnamon], soluble coloring matter wears yellow-brown.

(4) Starch and a mineral salt agar medium (4 or 27 degrees-C culture of ISP-culture media)

On colorless growth, white aerial mycelium is grown slightly, and soluble coloring matter is not accepted.

[0019] (5) Thyrosin agar medium (7 or 27 degrees-C culture of ISP-culture media)

Growing white aerial mycelium on growth of light yellow tea [2lg, Mustard Tan] - gray tint yellow-brown [3lg, Adobe Brown], soluble coloring matter presents light yellow tea.

(6) Nutrient agar medium (27-degree-C culture)

White aerial mycelium is slightly grown on growth of light yellow [2ea, Lt Wheat], and soluble

coloring matter is not accepted.
(7) Yeast and a malt-agar culture medium (2 or 27 degrees-C culture of ISP-culture media)
White aerial mycelium is slightly grown on growth of light yellow tea [3ic, Lt Amber], and soluble coloring matter is not accepted.
(8) Oatmeal agar medium (3 or 27 degrees-C culture of ISP-culture media)
White aerial mycelium is slightly grown on growth of colorlessness - light yellow [1 1/2ca, Cream], and soluble coloring matter is not accepted.
(9) Starch agar medium (27-degree-C culture)
On colorless growth, white aerial mycelium is grown slightly, and soluble coloring matter is not accepted.
(10) Malic-acid lime agar medium (27-degree-C culture)
On colorless growth, white aerial mycelium is grown slightly, and soluble coloring matter is not accepted.
[0020] 3. Physiological property (1) As a result of examining using a growth temperature requirement glucose asparagine agar medium (glucose 1.0% and L-asparagine 0.05%, potassium phosphate 0.05%, string agar 3.0%, pH7.0) at each temperature of 10 degrees C, 20 degrees C, 24 degrees C, 27 degrees C, 30 degrees C, 37 degrees C, and 50 degrees C, growth at 10 degrees C and 50 degrees C was not accepted, but be grown in 20 degrees C - 37 degrees C. Growth optimum temperature is considered to be near 27 degree C.
(2) Hydrolysis of starch (starch and a mineral salt agar medium, the ISP-culture medium 4 and a starch agar medium, and all are cultivated 27 degrees C)
In the culture for 21 days, it is negative also in which culture medium.
(3) Generation of melanin Mr. coloring matter (trypton yeast broth, ISP-culture-medium 1;peptone yeast and an iron agar medium, an ISP-culture-medium 6; thyrosin agar medium, the ISP-culture medium 7; all are cultivated 27 degrees C)
Also in which culture medium, it is negative.
[0021] (4) Availability of a carbon source (9; 27 degrees-C culture of PURIDOHAMU GODORIBU agar-medium and ISP-culture media)
It grows using D-glucose, D-fructose, an inositol, and D-mannitol, and L-arabinose, sucrose, rhamnose, and a raffinose are not used. It is not [the existence or nonexistence of use of D-xylose] ascertained.
(5) The dissolution of malic-acid lime (a malic-acid lime agar medium, 27-degree-C culture)
The dissolution of malic-acid lime is accepted around [after culture] the 10th, and the operation is whenever [middle].
(6) The reduction reaction of a nitrate (8 or 27 degrees-C culture of 0.1% potassium-nitrate content peptone water and ISP-culture media)
It is negative.
[0022] If the above description is summarized, on the gestalt, MK299-95F4 share will branch radical viable cell yarn well, will present the shape of JIGUZAKU, and will accept fragmentation. Aerial mycelia have the shape of direct, and the shape of irregular music, and are divided in the fragment of a cylindrical shape - an ellipse, or the spore's structure. a whorl branch, ******, and a spore obtain and a movement sexual spore is not accepted. By various culture media, white aerial mycelium is grown on growth of colorlessness light yellow - light yellow tea. Soluble coloring matter wears yellow or yellow-brown by a part of culture media. Each of generation of melanin Mr. coloring matter, water solubility of starch, and reduction reactions of a nitrate is negative.
[0023] By the way, the MK299-95F4 share fungus body component showed the cell wall type IV mold to the cell wall including the 2,6-diaminopimelic acid, the arabinose, and the galactose of a meso mold. The reducing sugar in [all] a fungus body were A molds containing arabinose and a galactose. The result of a glycolate test was an acetyl mold. Moreover, mycolic acid was not contained, but phospholipid was a PII mold (phosphatidylcholine and strange glucosamine content phospholipid are not included including phosphatidylethanolamine), and main menaquinones were MK-9 (H4). a fatty acid -- 16:0, i-15:0, 16:1, and i- 16:0 and 17:0 were used as the principal component.

[0024] From the above result, MK299-95F4 share is Amycolatopsis (Amycolatopsis). It is thought that it belongs to a group (reference: "International Journal of Systematic Bacteriology" 36 volumes, 29 - 37 pages, 1986). Retrieval of the known strain of the Amycolatopsis group raised Amycolatopsis SURUFUREA (Amycolatopsis sulphurea) (reference 1:same-as-the-above; and reference 2: "International Journal of Systematic Bacteriology" 37 volumes, 292 - 295 pages, 1987) as a kind of a close relationship. Then, MK299-95F4 share and this laboratory preservation strain of Amycolatopsis SURUFUREA are [comparison] under examination to practice. this time -- MK299-95F4 share -- Amycolatopsis ESUPI (Amycolatopsis sp.) -- it is referred to as MK299-95F4. In addition, the deposition application of the MK299-95F4 share was made in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, and it was entrusted with the deposition number as FERM P-15243 on October 17, Heisei 7.
[0025] In enforcing the approach of the 2nd this invention, the epoxy quinomycin A belonging to the Amycolatopsis group and the production bacillus of B are inoculated into a nutrition culture medium, and it cultivates in this culture medium. The nutrition culture medium used here contains the carbon source and nitrogen source which can carry out utilization of the aforementioned production bacillus as a nutrition component.
[0026] As the nutrient, nutrients which can be assimilated, such as what is usually used as a nutrient of a microorganism, for example, a carbon source, a nitrogen source, and mineral salt, can be used. For example, the mineral salt of dipotassium phosphate, sodium phosphate, salt, a calcium carbonate, magnesium sulfate, a manganese chloride, etc. can be used for nitrogen sources, such as the carbon source like fats and oils, such as hydrocarbons, such as grape sugar, a maltose, molasses, a dextrin, a glycerol, and starch, and soybean oil, peanut oil, and a peptone, a meat extract, cottonseed powder, a soybean meal, a yeast extract, casein, corn steep liquor, NZ-amine, an ammonium sulfate, an ammonium nitrate, and an ammonium chloride and a pan, and a trace element, for example, cobalt, iron etc. be added as occasion demands If a use bacillus can use for producing antibiotic epoxy quinomycin A and B in addition to this as a nutrient, any well-known nutrient can be used.
[0027] Especially the blending ratio of coal of the nutrient like the above in a culture medium is not restrained, can continue broadly and can be changed, and if the optimal presentation and the optimal blending ratio of coal of a nutrient are a person concerned by the epoxy quinomycin A and B production bacillus to be used, an easy bench scale test can determine easily. Moreover, the nutrition culture medium which consists of the above-mentioned nutrient can be sterilized in advance of culture, and, as for the front stirrup of this sterilization, it is advantageous to adjust pH of a culture medium later in the range of 6-8, especially the range of pH 6.5-7.5.
[0028] Culture of the epoxy quinomycin A in this nutrition culture medium and B production bacillus can be performed according to the approach usually used in manufacture of the antibiotic by the common Actinomyces. Usually, it can carry [while cultivating under an aerobic condition is suitable and it stirs and/or] out, carrying out aeration. Moreover, although both stationary culture shaking culture and the submerged culture accompanied by aeration stirring are usable as the culture approach, liquid culture is suitable for mass production method of epoxy quinomycin A and B.
[0029] Although the culture temperature which can be used can be suitably chosen according to the production bacillus which growth of epoxy quinomycin A and B production bacillus is not substantially checked, it is not especially restricted if it is the range which can produce this antibiotic, and is used, especially a desirable thing can mention the temperature within the limits of 25 to 30 degree C. Culture is continuable until epoxy quinomycin A and B are usually fully accumulated. Although the culture time amount changes with the presentation of a culture medium, culture temperature and service temperature, use production strain, etc., the target antibiotic can usually be obtained by culture of 72-120 hours.
[0030] The epoxy quinomycin A in the culture medium under culture and the accumulated dose of B can use staphylococcus AUREUSU Smith, and he can do a quantum with the cup method used for the quantum of the usual antibiotic.
[0031] The epoxy quinomycin A and B which were accumulated into the culture in this way

extract this from a culture. After culture and according to the need, after removing a fungus body from a culture by the separation approaches well-known in itself, such as filtration and centrifugal separation, isolation purification of the chromatography using the chromatography and gel filtration which adjusted the culture filtrate to acidity (pH 2-4), and used the solvent extraction using an organic solvent, especially ethyl acetate, etc., adsorption, and ion-exchange ability, and countercurrent distribution can be carried out by using it, being independent or combining, and the target antibiotic can be extracted. As support for chromatographies which has adsorption and ion-exchange ability, activated carbon, silica gel, porous polystyrene-divinylbenzene resin, or various kinds of ion exchange resin can be used. Moreover, from the separated fungus body, the target antibiotic can be extracted from a fungus body by the solvent extraction method using a suitable organic solvent, or the melting by fungus body crushing, and isolation purification can be carried out like the above. The new antibiotic epoxy quinomycin A and B which have the above mentioned property in this way are obtained.

[0032] furthermore, in the 3rd this invention, the antimicrobial agent which makes an active principle the epoxy quinomycin A expressed with a general formula (I) and (or) epoxy kino mycin B, or those pharmaceutically permissible salts is offered.

[0033] moreover, in the 4th this invention, the antitumor agent which makes an active principle the epoxy quinomycin A expressed with a general formula (I) and (or) epoxy kino mycin B, or those pharmaceutically permissible salts is offered.

[0034] in this antimicrobial agent or antitumor agent, the epoxy quinomycin A as an active principle and (or) B, or its salt can be a formal constituent with which it is mixed with the solid-state of pharmaceutically permissible daily use or liquid support, for example, ethanol, water, starch, etc.

[0035] Moreover, Amycolatopsis with the property of producing the epoxy quinomycin A of the aforementioned general formula (I), and B as a new microorganism in the 5th this invention sp.MK299-95F4 A stock is offered.

[0036]

[Embodiment of the Invention] Next, although an example explains this invention to a detail further, this invention is not limited to the following example.

[0037] Example 1 Antibiotic epoxy quinomycin A and manufacture glycerol of B 0.5%, shoe cloth 2%, soybean meal 1%, dry yeast 1%, corn steep liquor 0.5%, cobalt chloride Liquid medium containing 0.001% (it adjusts to pH7.0) Erlenmeyer flask (500ml **) It pours 110ml distributively at a time, and is a conventional method. It sterilized at 120 degrees C for 20 minutes. Amycolatopsis cultivated to these culture media at the agar slant medium sp.MK299-95F4 The stock (FERM P-15243) was inoculated and rotary shaking culture was carried out for five days at 30 degrees C after that. This obtained **** culture medium.

[0038] Glycerol 2%, dextrin 2%, bacto-SOITON 1%, powder yeast extract 0.3%, ammonium sulfate 0.2%, calcium carbonate Liquid medium which contains one drop of silicone oil 0.2% (it adjusts to pH7.4) Erlenmeyer flask (500ml **) It pours 110ml distributively at a time, and is a conventional method. It sterilized at 120 degrees C for 20 minutes. Then, it inoculated the 2ml of the above-mentioned **** culture medium into these culture media at a time, respectively, and rotary shaking culture was carried out to them for four days at 27 degrees C.

[0039] Thus, the obtained culture medium was filtered and the fungus body was separated. 2.5l. of culture filtrates is 6 N-HCl. After making it pH2, it extracted by 2.5l. of butyl acetate, and the butyl-acetate layer was dried with anhydrous sodium sulfate. Concentration hardening by drying was carried out under reduced pressure of a butyl-acetate layer, residue was melted to methanol 50ml, it washed twice by hexane 50ml, and concentration hardening by drying was carried out under reduced pressure of a methanol layer.

[0040] If chloroform-methanol-water (50:10:40,100ml) distributes the obtained residue and concentration hardening by drying is carried out under reduced pressure of a lower layer, it is brown oily matter (0.515g). It was obtained. This oily matter was given to the silica gel column chromatography (Kieselgel 60, the Merck Co. make, 50ml), and sequential elution was carried out with the toluene-acetone mixed solvent (1 three: 10:1, 7:1, 5:1, 2:1). The obtained activity fraction was given to the silica gel column chromatography of these conditions, and sequential

elution was carried out with the toluene-acetone mixed solvent (1 ten: 50:1, 20:1, 7:1). Epoxy quinomycin A and the mixture of B 124mg was obtained. Separation purification was carried out having bet 35mg of this mixture on silica gel TLC (expansion solvent: a chloroform-methanol, 20:1).

[0041] Epoxy quinomycin A is the melting point. It is obtained with the yield of 20mg as light yellow powder of 168 to 173 degree C (decomposition), and epoxy kino mycin B is the melting point. It was obtained with the yield of 10mg as light yellow powder of 178 to 184 degree C (decomposition).

[Translation done.]

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]
[Drawing 1] It is an ultraviolet absorption spectrum in the methanol solution of epoxy quinomycin A.
[Drawing 2] 0.01Ns of epoxy quinomycin A It is an ultraviolet absorption spectrum in a NaOH-methanol solution.
[Drawing 3] It is an ultraviolet absorption spectrum in the 0.01N HCl-methanol solution of epoxy quinomycin A.
[Drawing 4] It is the infrared absorption spectrum measured with the KBr briquette method of epoxy quinomycin A.
[Drawing 5] It is the proton nuclear-magnetic-resonance spectrum measured with the heavy methanol solution (internal standard: trimethyl silane) of epoxy quinomycin A.
[Drawing 6] It is the carbon 13 nuclear-magnetic-resonance spectrum measured with the heavy methanol solution (internal standard: trimethyl silane) of epoxy quinomycin A.
[Drawing 7] It is the ultraviolet absorption spectrum of the methanol solution of epoxy kino mycin B.
[Drawing 8] 0.01Ns of epoxy kino mycin B It is an ultraviolet absorption spectrum in a NaOH-methanol solution.
[Drawing 9] It is an ultraviolet absorption spectrum in the 0.01N HCl-methanol solution of epoxy kino mycin B.
[Drawing 10] It is the infrared absorption spectrum measured with the KBr briquette method of epoxy kino mycin B.
[Drawing 11] It is the proton nuclear-magnetic-resonance spectrum measured with the heavy methanol solution (internal standard: trimethyl silane) of epoxy kino mycin B.
[Drawing 12] It is the carbon 13 nuclear-magnetic-resonance spectrum measured with the heavy methanol solution (internal standard: trimethyl silane) of epoxy kino mycin B.

[Translation done.]